

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale
10 octobre 2002 (10.10.2002)**

PCT

**(10) Numéro de publication internationale
WO 02/078760 A1**

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61L 27/38, C12N 5/00, 5/06

[FR/FR]; 739, chemin des Combes, F-06600 Antibes (FR). **CHEVALIER, Xavier, L.** [FR/FR]; 1, rue du Val de Grace, F-75005 Paris (FR). **MORFIN, Isabelle** [FR/FR]; 31, cours Jean Jaurès, F-38000 Grenoble (FR). **VACHER, Dominique, J.** [FR/FR]; La Palmeraie, Allée de St. Basile, F-06250 Mougin (FR).

(21) Numéro de la demande internationale : PCT/EP02/01121

PCT/FR02/01121

(22) Date de dépôt international : 29 mars 2002 (29.03.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité : 01/04405 30 mars 2001 (30.03.2001) FR

(71) **Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : LAB-ORATOIRES GENEVRIER** [FR/FR]; 280, rue de Goa, ZI Les Trois Moulins, Parc de Sophia Antipolis, F-06600 Antibes (FR). **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1** [FR/FR]; Laboratoire des matériaux polymères et des biomatériaux, Bât ISTIL, 43, bd du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex (FR). **INSERM** [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DO-MARD, Alain [FR/FR]; 74, bd des Belges, F-69006 Lyon (FR). CORVOL, Marie-Thérèse, M. [FR/FR]; 88, rue de Sèvres, F-75007 Paris (FR). GUILLOT, François

(74) Mandataire : HENNION, Jean-Claude; Cabinet Beau de Loménie, 27 bis, rue du Vieux Faubourg, F-59800 Lille (FR)

(81) **États désignés (national)** : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
 - avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING A CARTILAGINOUS NEO-TISSUE

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION D'UN NEO-TISSU CARTILAGINEUX

(57) Abstract: The invention concerns the preparation of a cartilaginous neo-tissue capable of being grafted. The method consists in: a) culturing chondrogenic cells, which are either autologous chondrocytes or cells precursors of chondrocytes prepared in vitro from pluripotent stem cells; b) contacting said chondrogenic cells with a chitosan hydrogel, having preferably a degree of acetylation ranging between 40 and 60 %, whereof the amphiphilic properties and the degree of acetylation is such that said cells adhere naturally to the outer surface of said hydrogel; c) covering the hydrogel/cell assembly thus obtained with a culture medium; and d) allowing a cartilaginous neo-tissue to develop in contact with the chitosan hydrogel during a minimum period of two weeks, frequently renewing the culture medium.

(57) Abrégé : L'invention concerne la préparation d'un néo-tissu cartilagineux greffable. Le procédé consiste: a) à mettre en culture des cellules chondrogéniques, qui sont soit des chondrocytes autologues soit des cellules précurseurs de chondrocytes préparées in vitro à partir de cellules souches pluripotentes, b) à mettre lesdites cellules chondrogéniques en contact avec un hydrogel de chitosane ayant de préférence un degré d'acétylation compris entre 40 et 60 % - dont les propriétés d'amphiphilie et le degré d'acétylation sont tels que lesdites cellules adhèrent naturellement à la surface extérieure dudit hydrogel, c) à recouvrir l'ensemble hydrogel/cellules ainsi obtenu par un milieu de culture et, d) à laisser se développer un néo-tissu cartilagineux au contact de l'hydrogel de chitosane pendant une durée minimale de deux semaines, en renouvelant fréquemment le milieu de culture.



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

PROCEDE DE PREPARATION D'UN NEO-TISSU CARTILAGINEUX

La présente invention concerne le domaine de la réparation des lésions cartilagineuses par mise en œuvre d'un greffon. Elle concerne plus particulièrement un procédé de préparation d'un néo-tissu cartilagineux greffable.

Le cartilage est un tissu d'origine mésenchymateuse constitué d'un faible pourcentage de chondrocytes réparties au sein d'une matrice extra-cellulaire dont elles assurent le renouvellement. Cette matrice est composée d'un réseau de fibres de collagène notamment de type II et de glycosaminoglycans associés à des protéines de structure pour former des protéoglycans. L'ensemble par sa nature amphiphile et ses sites ioniques forme un gel physique assurant les propriétés viscoélastiques du tissu cartilagineux.

Le tissu cartilagineux disparaît à l'âge adulte sauf au niveau des articulations, où son rôle est d'assurer le mouvement des surfaces articulaires et de supporter des charges compressives importantes. Le cartilage articulaire n'est cependant pas capable de se régénérer spontanément. C'est pourquoi en cas de lésions cartilagineuses on a recours aux techniques de greffe, telles que la greffe en mosaïque ou la greffe de cellules autologues.

La greffe en mosaïque consiste à effectuer des prélèvements d'os recouverts de cartilage dans des régions non portantes et à les greffer au niveau de la lésion.

La greffe de cellules autologues consiste à effectuer un prélèvement de cartilage sain, à le soumettre à une digestion enzymatique afin de libérer les chondrocytes de la matrice extra cellulaire, à faire se multiplier les chondrocytes ex-vivo jusqu'à obtention d'un nombre suffisant de chondrocytes, lesquels sont ensuite réimplantés au niveau de la lésion cartilagineuse. Les chondrocytes se présentant sous forme d'une suspension cellulaire en

milieu aqueux (dispersion dans un milieu liquide), il faut d'abord recouvrir la lésion préalablement débridée par une membrane faite de périoste suturé de façon étanche au bord du cartilage puis injecter dans la cavité ainsi créée la suspension (dispersion contenant la culture) de chondrocytes. Après un certain temps , ces cellules produisent une matrice extra-cellulaire qui n'a toutefois pas l'organisation tissulaire du cartilage articulaire normal.

Il est à noter que le mode de multiplication des chondrocytes à planter doit être déterminé en sorte d'éviter une dédifférenciation des cellules . En particulier si l'on fait proliférer des chondrocytes sur un support (polymère synthétique) comme celui du fond des boîtes de cultures cellulaires, les chondrocytes se dédifférencient en cellules fibroblastiques. Elles sont alors fusiformes au lieu d'être polygonales comme des chondrocytes et synthétisent du collagène I au lieu du collagène II.

On a déjà proposé, dans le document WO.00/56251 de faire se multiplier des cellules , parmi lesquelles des chondrocytes humains , sur des billes de polysaccharides biodégradables et réticulées par des polyamines . Les polysaccharides sont choisis notamment parmi les composés suivants : dextrane, cellulose, arabinogalactane, pullulan et amylose. L'agent de réticulation est par exemple l'acide glutamique, la lysine , l'albumine ou la gélatine.

Selon ce document , après avoir été mis en contact avec lesdites billes de polymère sous agitation mécanique, les chondrocytes se multiplient en gardant leur forme et leur phénotype , et synthétisent tout particulièrement du collagène II.

Après cette multiplication, les chondrocytes sont récupérés en digérant les billes de polysaccharides à l'aide d'enzymes spécifiques, par exemple la dextranase , qui n'altèrent pas les cellules chondrocytaires.

Lesdites cellules sont ensuite détachées pour être incluses dans une matrice de chitosane. Pour ce faire des chondrocytes sont ajoutés à une solution acide de chitosane , puis le mélange est agité jusqu'à la formation d'une structure tridimensionnelle que l'on place dans une 5 solution de soude 1N en sorte d'obtenir la précipitation du chitosane en quelques minutes. La soude est ensuite rapidement éliminée puis le conglomérat de chitosane et de cellules est mis en culture à 37°C, 5% de CO₂ pendant une durée déterminée.

Ainsi selon ce document WO.00/56251, les chondrocytes 10 mélangés avec le chitosane sont incorporés, inclus dans la structure tridimensionnelle du chitosane précipité, laquelle structure aurait une consistance ferme ressemblant à la texture du cartilage.

Dans le document WO.00/56251 est prévue une autre variante possible au niveau de la première étape de multiplication des 15 chondrocytes à savoir de faire multiplier lesdites cellules sur un film de chitosane. Les deux autres étapes restent identiques , la seconde consistant à extraire les chondrocytes ainsi multipliés par digestion enzymatique par la collagénase ou par la trypsine et la troisième étape consistant à incorporer, à inclure lesdites chondrocytes dans une 20 matrice tri-dimensionnelle de chitosane, dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Le demandeur émet des doutes que les chondrocytes puissent encore être viables après avoir été soumis successivement à un milieu acide puis à un milieu fortement basique , comme cela est enseigné 25 dans le document WO.00/56251 pour la précipitation du chitosane autour desdites cellules

Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine, bio-polymère le plus répandu dans la nature après la cellulose. La chitine peut être extraite de l'exosquelette de certains crustacés tels que le 30 homard, le crabe ou de l'endosquelette de calamar, par exemple. La

chitine et le chitosane sont constitués des deux mêmes unités monomères , le N-acétylD glucosamine et le D-glucosamine. Lorsque le polymère est fortement acétylé , c'est-à-dire lorsqu'il comprend plus de 60% de N-acétyl-D-glucosamine, il est appelé chitine. Tous deux 5 sont biodégradables, biorésorbables et compatibles avec les tissus vivants.

Le chitosane est connu pour avoir une activité biostimulante sur la reconstitution des tissus. Il est cependant généralement utilisé en association avec d'autres éléments. Par exemple dans le document 10 WO.96/02259 , le chitosane est combiné avec un autre polysaccharide pour former un agent de stimulation de la régénération des tissus durs au niveau d'un site d'intégration d'un implant, par exemple en titane.

Par exemple dans le document WO.99/47186, le chitosane est 15 réticulé avec un glycosaminoglycane pour constituer un environnement biochimique proche du tissu cartilagineux , stimulant la croissance cellulaire.

Le procédé de la présente invention s'apparente au document 20 WO.00/56251 en ce qu'il met en œuvre du chitosane qui n'est associé à aucun autre constituant . Cependant il s'en distingue par le fait qu'il ne nécessite pas trois opérations successives.

Le procédé de la présente invention concerne la préparation d'un néo-tissu cartilagineux greffable. Il consiste :

- a) à mettre en culture des cellules chondrogéniques , qui sont soit 25 des chondrocytes autologues soit des cellules précurseurs de chondrocytes préparés in vitro à partir de cellules souches pluripotentes,
- b) à mettre lesdites cellules chondrogéniques en contact avec la surface extérieure d'un hydrogel fait exclusivement de chitosane dont les propriétés d'amphiphilie et le degré 30

- 5 -

- d'acétylation sont tels que lesdites cellules adhèrent naturellement à ladite surface extérieure,
- c) à recouvrir l'ensemble hydrogel/cellules ainsi obtenu par un milieu de culture et,
 - 5 d) à laisser se développer un néo-tissu cartilagineux au contact de la surface de l'hydrogel de chitosane, et sans pénétration des cellules pendant une durée minimale de deux semaines, en renouvelant fréquemment le milieu de culture.

Ainsi, au contraire de ce qui est proposé dans le document
10 WO.00/56251, le processus d'amplification des cellules chondrogéniques se fait soit de façon spontanée au contact de la surface extérieure de l'hydrogel de chitosane, soit après amplification préalable dans les conditions classiques de culture à haute densité. De plus la formation de la matrice extra-cellulaire se fait de façon
15 simultanée, en présence de l'hydrogel de chitosane.

L'adhésion naturelle des cellules à la surface extérieure de l'hydrogel de chitosane permet d'obtenir une très bonne répartition desdites cellules et évite la perte de cellules lors de l'opération, par exemple lorsque celle-ci est réalisée dans des puits de culture.

20 L'hydrogel de chitosane joue un rôle d'inducteur sur le phénotype des cellules chondrogéniques, lesquelles prolifèrent sans se dédifférencier, tout en conservant leur phénotype chondrocytaire et leur potentiel de maturation cellulaire.

Il est à noter que les cellules chondrogéniques ne pénètrent pas
25 directement à l'intérieur de l'hydrogel, celui-ci ayant une taille de pores (en surface et dans la masse) insuffisante au regard de la taille desdites cellules. L'hydrogel de chitosane est progressivement métabolisé et/ou remplacé et/ou envahi par les protéines matricielles de type cartilage, qui sont néo-synthétisées par les chondrocytes.
30 Après au moins deux semaines de culture , l'ensemble – constitué par

les chondrocytes et la matrice extra-cellulaire - réalise un néo-tissu cartilagineux qui peut être greffé en l'état, l'hydrogel de chitosane qui sert transitoirement de support à ce néo-tissu cartilagineux étant en partie ou en totalité biodégradé, et ne participant pas à la greffe,

5 contrairement à ce qui est prévu dans les documents WO.OO/56251 et WO.99/47186 dans lesquels c'est la structure tridimensionnelle dans laquelle sont incluses les chondrocytes qui fait office de greffe.

Le degré d'acétylation du chitosane , mis en œuvre pour la préparation de l'hydrogel , est compris entre 30 et 70% ; de
10 préférence celui-ci est compris entre 40 et 60%.

Selon une première variante de réalisation, les cellules chondrogéniques sont mises en contact avec la surface extérieure de l'hydrogel de chitosane qui se présente sous la forme de petites particules de quelques millimètres.

15 Selon une seconde variante de réalisation , les cellules chondrogéniques sont étalées sous forme d'au moins une nappe entre au moins deux couches d'hydrogel de chitosane, chaque couche faisant de l'ordre de quelques millimètres d'épaisseur. Cette disposition particulière permet d'obtenir très facilement un néo-tissu
20 cartilagineux de grande dimension, après totale disparition de l'hydrogel de chitosane.

Le néo-tissu de cartilage formé grâce au procédé de l'invention se caractérise en ce qu'il est constitué de rangées de cellules plus ou moins parallèles, présentant un gradient de maturation cellulaire
25 orienté depuis une zone déterminée vers sa périphérie, la zone déterminée correspondant à la zone de jonction des cellules avec l'hydrogel de chitosane. Lorsque ce néo-tissu est analysé en histologie, son aspect morphologique est proche d'un tissu cartilagineux normal .

La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la
30 description qui va être faite de plusieurs exemples de préparation

- 7 -

d'un néo-tissu cartilagineux mettant en œuvre comme support d'amplification un hydrogel de chitosane dont le degré d'acétylation est compris entre 40 et 60%.

PURIFICATION DU CHITOSANE

5 Le chitosane de référence utilisé est obtenu à partir d'endo-squelettes de calamars. Il a un degré d'acétylation de 5,2%. Il est tout d'abord purifié afin d'éliminer les particules non solubles , en mettant en œuvre les étapes suivantes : mise en solution, filtration, précipitation, lavage et lyophilisation.

10 Pour sa mise en solution, on prépare une solution de faible viscosité , avec une concentration de l'ordre de 0,5% en poids de chitosane dans une solution acide. Plus précisément l'acide acétique est mis en quantité stoechiométrique par rapport aux groupements amine du chitosane.

15 La solution de polymère est filtrée par passages successifs sur des membranes de porosités décroissantes (1,2 ; 0,8 et 0,45 µm) sous une pression maximale de 3 bars.

Le polymère est précipité en remontant le pH de la solution par ajout d'une solution d'ammoniaque concentrée , sous agitation.

20 Plusieurs opérations de lavage sont ensuite nécessaires pour diminuer le pH de la suspension en éliminant l'ammoniaque en excès. Après chaque lavage la suspension est centrifugée et le culot récupéré. Le lavage intervient jusqu'à stabilisation du pH de l'eau de lavage à une valeur qui est fonction du degré d'acétylation.

25 La lyophilisation permet d'obtenir le chitosane sous forme solide.

ACÉTYLATION DU CHITOSANE

Le chitosane est ensuite réacétylé pour obtenir le degré d'acétylation désiré. Cette réacétylation est réalisée par réaction de la

fonction amine avec l'anhydride acétique en milieu hydro-alcoolique. Le rapport entre le nombre des fonctions amines et le nombre de molécules d'anhydride présent en solution détermine le degré d'acétylation du chitosane produit. Pour un chitosane ayant un degré 5 d'acétylation donné , on met en œuvre une solution hydro-alcoolique qui comprend , outre le chitosane , de l' eau , du 1,2-propanadiol et la quantité nécessaire d'acide acétique pour avoir une quantité stoechiométrique par rapport aux fonctions amines du chitosane. Dans un exemple précis de réalisation, la solution hydro-alcoolique 10 comprenait 3g de chitosane , 323 g d'eau et de 272 g de 1,2- propanadiol. Le mélange acétylant comprend l'anhydride acétique et du propanediol. Par exemple pour 62,38 g de propanediol, le mélange comprenait 1,26ml d'anhydride acétique pour obtenir un degré d'acétylation du chitosane de 50% et 1,62ml d'anhydride 15 acétique pour obtenir un degré d'acétylation de 60%.

FORMATION DE L'HYDROGEL PHYSIQUE DE CHITOSANE

Cette formation nécessite le passage d'un état liquide à un état de gel. Ce passage correspond à une situation antérieure (état liquide) où les interactions hydrophiles dominent à une situation postérieure 20 (état d'hydrogel) où les interactions hydrophobes deviennent suffisamment fortes pour qu'il n'y ait plus dissolution sans toutefois être assez fortes pour provoquer la complète précipitation du polymère. Le mode de préparation préféré , selon l'invention , part d'une solution initiale de chitosane. Si nécessaire, selon le degré 25 d'acétylation, il s'agira d'une solution acide, le chitosane étant mis en solution dans de l'acide chlorhydrique en quantité stoechiométrique avec les groupements amines du chitosane. Après dissolution complète du chitosane, un certain volume de 1,2 propanediol est ajouté goutte à goutte à la solution qui est ensuite dégazée sous vide 30 pendant une durée d'environ une heure. La solution est ensuite

versée dans un récipient permettant d'avoir un grand rapport surface libre sur volume et est mise en étuve à 45°C pendant le temps nécessaire à sa prise en gel. Ainsi la formation de l'hydrogel de chitosane est obtenue par un processus physico-chimique. Il ne s'agit
5 pas d'un précipité mais d'un véritable hydrogel physique , qui est un matériau viscoélastique ne contenant que du chitosane et plus de 90% d'eau. Contrairement à un précipité , un tel hydrogel ne se disloque pas par agitation ou dilution.

Pour obtenir un hydrogel qui ne soit pas soluble dans l'eau à
10 des pH de l'ordre de 6 ou 7, on réalise une neutralisation de l'hydrogel ainsi obtenu par passage pendant environ une heure en milieu basique , par exemple de la soude O,1 molaire.

La diminution du nombre de charges positives dues à l'augmentation du pH favorise les interactions hydrophobes et la
15 formation de liaisons hydrogène,et donc la stabilité du gel.On procède ensuite à un lavage de l'hydrogel pour éliminer l'alcool et obtenir un pH d'environ 7.C'est cet hydrogel de chitosane ,lavé,qui sera mis en œuvre pour la mise en culture des cellules chondrogéniques.

Il est à noter que la prise en gel correspond à un rapport solution aqueuse / 1-2 propanediol déterminé , rapport qui dépend du degré d'acétylation du chitosane. De plus , la gélification s'accompagnant d'une perte en eau , il importe que les conditions opératoires favorisent cette évaporation de l'eau.
20

Plusieurs types de récipients peuvent être utilisés lors de la gélification, que ce soit des boîtes de pétri , des boîtes multi-puits ou encore des inserts spécialement conçus pour être logés dans les puits de boîtes multi-puits. Par exemple on met en œuvre une plaque de 24 puits équipés d'inserts, chaque insert étant constitué d'un cône en
25 plastique dont le fond est formé d'une membrane perméable au
30

- 10 -

liquide de nutrition et qui est agencé pour être déposé dans chaque puits sans en toucher le fond.

MISE EN CULTURE

Les cellules chondrogéniques peuvent être des chondrocytes 5 autologues ou des cellules précurseurs de chondrocytes préparées , in vitro , à partir de cellules souches pluripotentes.

Quel que soit le récipient utilisé pour la formation de l'hydrogel, l'hydrogel obtenu se présente sous la forme d'un bloc visco-élastique et translucide, dont la capacité et la résistance 10 dépendent notamment de la concentration en chitosane de la solution initiale. De préférence , cette concentration est de 0,5 à 4%. Pour la mise en culture des cellules chondrogéniques , il est tout d'abord nécessaire d'augmenter la surface de mise en contact entre l'hydrogel de chitosane et lesdites cellules. Pour cela selon une 15 première variante , le bloc d'hydrogel de chitosane est découpé en petits fragments dont les dimensions extérieures sont de l'ordre de quelques millimètres. Ces fragments sont disposés dans les puits d'une plaque multi-puits ou éventuellement dans les inserts équipant une telle plaque.Les cellules chondrogéniques sont introduites sous forme 20 de suspension et mélangées délicatement aux fragments d'hydrogel . L'ensemble est recouvert d'un milieu de culture approprié. On constate que les cellules chondrogéniques adhèrent spontanément à la surface extérieure des fragments d'hydrogel et ne tombent pas dans le fond des puits. La mise en culture est effectuée en mettant les 25 plaques ainsi garnies dans une atmosphère de 10% de CO₂ à 37°C. Le milieu de nutrition est renouvelé deux fois par semaine. La culture se poursuit pendant un temps variable qui peut aller de 2 à 6 semaines selon la taille souhaitée pour le néo-tissu cartilagineux qui se forme au contact de l'hydrogel de chitosane.

30 Il faut choisir une proportion ou ratio : « nombre de

cellules/fragment de l'hydrogel de chitosane » de façon à éviter le plus possible que certaines cellules ne tombent au fond du puits. Dans un exemple précis de réalisation, on a placé 5.10^5 cellules chondrogéniques pour une trentaine de fragments d'hydrogel de chitosane par insert ou 1 à 3.10^6 cellules chondrogéniques pour une centaine de fragments d'hydrogel de chitosane par puits, non équipé d'insert.

Le degré d'acétylation, compris entre 30 et 70% , mais de préférence entre 40 et 60% induit des conditions d'amphiphilie optimales favorables à l'établissement d'un environnement propice à la synthèse du néo-tissu cartilagineux . En effet , en augmentant le degré d 'acétylation , on contribue à renforcer les interactions hydrophobes dues aux fonctions N-acétamides. Simultanément , on accroît aussi la cationicité des sites amine résiduels , renforçant par là-même leur caractère hydrophile et leur aptitude à créer des interactions électrostatiques. Toutes ces conditions sont favorables à l'établissement d'interactions avec les protéoglycans de la matrice extracellulaire néo-formés par les cellules chondrogéniques.

De plus les conditions de pH, de l'ordre de 7 sont favorables à l'action d'enzymes , par exemple le lysosome, sécrété par les chondrocytes et permettant la dégradation par hydrolyse de liaisons glycosuriques constituant la chaîne du chitosane.

Dans les conditions indiquées ci-dessus, les chondrocytes se multiplient et synthétisent simultanément une matrice importante qui s'accumule autour des cellules et remplace ou recouvre progressivement l'hydrogel de chitosane. Il est d'ailleurs possible de suivre la formation de ce néo-tissu cartilagineux en fonction du temps de culture. Au stade précoce de la culture, les cellules chondrogéniques adhèrent à l'hydrogel sans jamais le pénétrer , elles secrètent des protéines matricielles du type collagène et protéo-

glycane qui s'accumulent autour des cellules et qui forment une couche plus dense le long de l'hydrogel, entre les cellules et l'hydrogel qui conserve son aspect initial. Lorsque la culture se poursuit, notamment pendant de quatre à six semaines, les cellules chondrogéniques se multiplient à partir des cellules bordant l'hydrogel et les protéines matricielles continuent à s'accumuler. La structure de l'hydrogel se modifie prenant progressivement des colorations qui sont spécifiques des protéines collagéniques et des protéo-glycanes. On obtient en fin de culture un bloc de tissu néo-formé constitué de plusieurs colonies de cellules organisées en rangées plus ou moins parallèles et présentant un gradient de maturation cellulaire qui est orienté depuis la zone de jonction des cellules avec l'hydrogel vers sa périphérie. En analysant ce bloc de néo-tissu en histologie, on constate que son aspect morphologique est proche d'un tissu cartilagineux normal. Une analyse moléculaire par RT-PCR a été réalisée après cinq semaines de culture, pour l'expression des collagènes I et II, agrécane, biglycane et décorine. Les ARN messagers de collagène II, d'agrécane, de biglycane et de décorine sont exprimés alors que ceux du collagène I ne sont pas détectables. Au niveau protéique, la synthèse de protéoglycane a été étudiée après incorporation du soufre 35. Les protéoglycanes ont été extraits du néo-tissu par le chlorure de guanidine 4M, purifiés et analysés par chromatographie sur colonne de sépharose 2B. Les profils d'élution obtenus montrent que les cellules ont synthétisé et sécrété des protéo-glycanes qui se sont regroupés dans la matrice sous forme d'agrégats de haut poids moléculaire, avec un profil similaire à ceux synthétisés et sécrétés *in vivo*.

Selon une seconde variante de réalisation, les cellules chondrogéniques ont été étalées, sous forme de nappe, entre des couches d'hydrogel, chaque couche ayant une épaisseur de l'ordre de

quelques millimètres. Par exemple quatre nappes de cellules ont été étalées en combinaison avec trois couches d'hydrogel , à savoir deux nappes respectivement sur les faces extérieures de la première et de la troisième couche d'hydrogel et deux nappes prises en sandwich entre 5 respectivement la première et la seconde couche et la seconde et troisième couche d'hydrogel.

La mise en culture des cellules a été réalisée dans les mêmes conditions que ci-dessus et on a procédé aux mêmes constatations en ce qui concerne la formation d'un néo-tissu cartilagineux. Les colonies 10 cellulaires qui se sont formées soit à partir des cellules en contact avec la face extérieure de la première et de la troisième couche d'hydrogel soit à partir des cellules étalées entre deux couches d'hydrogel présentent toutes un gradient morphologique similaire à celui qui a été décrit ci-dessus. Les couches d'hydrogel , intercalées entre les 15 nappes de cellules , ont disparu et sont remplacées par une structure fibrillaire très alcyanophile dont l'épaisseur correspond environ à la superposition de deux à trois couches de cellules. On comprend que cette dernière variante mettant en œuvre une superposition de couches d'hydrogel de chitosane et de cellules chondrogéniques 20 permet d'obtenir très facilement un néo-tissu cartilagineux de plus grande dimension.

Quelle que soit la variante mise en œuvre , le néo-tissu cartilagineux qui est obtenu selon le procédé de l'invention est apte à être greffé en l'état pour la réparation des lésions cartilagineuses, 25 méniscales ou de disques intervertébraux notamment des lésions de tailles importantes.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un néo-tissu cartilagineux greffable caractérisé en ce qu'il consiste :

- a) à mettre en culture des cellules chondrogéniques , qui sont soit des chondrocytes autologues soit des cellules précurseurs de chondrocytes préparées *in vitro* à partir de cellules souches pluripotentes,
- b) à mettre lesdites cellules chondrogéniques en contact avec la surface extérieure d'un hydrogel fait exclusivement de chitosane dont les propriétés d'amphiphilie et le degré d'acétylation sont tels que lesdites cellules adhèrent naturellement à la surface extérieure dudit hydrogel ,
- c) à recouvrir l'ensemble hydrogel/cellules ainsi obtenu par un milieu de culture et ,
- d) à laisser se développer un néo-tissu cartilagineux au contact de la surface de l'hydrogel de chitosane et sans pénétration des cellules à l'intérieur dudit hydrogel pendant une durée minimale de deux semaines , en renouvelant fréquemment le milieu de culture.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'hydrogel de chitosane a un degré d'acétylation compris entre 30 et 70%, de préférence entre 40 et 60%.
- 25 3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisé en ce que l'hydrogel de chitosane est préparé en mettant en œuvre les étapes suivantes :
- on ajoute à une solution de chitosane une quantité déterminée de 1,2 propanediol , quantité qui est fonction du degré d'acétylation du chitosane,

- on dégaze sous vide,
 - on verse la solution dégazée dans un récipient permettant d'avoir un grand rapport surface libre sur volume que l'on place en étuve à 45°C jusqu'à la prise en gel,
- 5 - on neutralise et on lave l'hydrogel de chitosane obtenu.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la mise en contact des cellules chondrogéniques avec l'hydrogel de chitosane se fait en mélangeant lesdites cellules en suspension avec des fragments d'hydrogel de chitosane dont les dimensions font de
- 10 l'ordre de quelques millimètres.
5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que la mise en contact des cellules chondrogéniques avec les fragments d'hydrogel de chitosane se faisant dans un puits, la proportion du nombre de cellules par rapport aux fragments d'hydrogel est déterminée de
- 15 façon à éviter le plus possible que certaines cellules ne tombent au fond du puits.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la mise en contact des cellules chondrogéniques avec l'hydrogel de chitosane se fait en étalant les cellules sous forme de nappe sur
- 20 l'hydrogel de chitosane se présentant sous la forme de couche de quelques millimètres d'épaisseur.
7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que les cellules chondrogéniques sont étalées sous forme de plusieurs nappes en contact avec plusieurs couches d'hydrogel de chitosane.
- 25 8. Néo-tissu cartilagineux greffable , obtenu par le procédé de l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est constitué de rangées de cellules plus ou moins parallèles , présentant un gradient de maturation cellulaire orienté depuis une zone déterminée vers sa périphérie, la zone déterminée correspondant notamment à la zone
- 30 de jonction des cellules avec l'hydrogel de chitosane.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61L27/38 C12N5/00 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61L C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 56251 A (CHONDROS INC) 28 September 2000 (2000-09-28) cited in the application page 31 -page 37 ---	1-8
X	WO 99 47186 A (SUH JUN KYO ;FU FREDDIE H (US); MATTHEW HOWARD (US); UNIV PITTSBUR) 23 September 1999 (1999-09-23) cited in the application example 13 ---	1-8 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July 2002

Date of mailing of the international search report

07/08/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/01121

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! October 1998 (1998-10) ZHANG W ET AL: "'Tissue engineering of hyaline cartilage!" Database accession no. NLM11825472 XP002207812 abstract & ZHONGHUA WAI KE ZA ZHI 'CHINESE JOURNAL OF SURGERY!', vol. 36, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 591-593, ISSN: 0529-5815</p> <p>---</p> <p>US 5 624 679 A (HELTON MIKE ET AL) 29 April 1997 (1997-04-29) paragraphs '5.6.1.5!, '17.1!</p> <p>---</p> <p>FRANCIS SUH J-K ET AL: "Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review" BIOMATERIALS, vol. 21, no. 24, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 2589-2598, XP004217422 ISSN: 0142-9612</p> <p>-----</p>	1-8
A		3
A		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/01121

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0056251	A 28-09-2000	US AU EP WO US US	6378527 B1 3626700 A 1171057 A1 0056251 A1 2001014475 A1 2001051834 A1	30-04-2002 09-10-2000 16-01-2002 28-09-2000 16-08-2001 13-12-2001
WO 9947186	A 23-09-1999	AU WO	3097999 A 9947186 A1	11-10-1999 23-09-1999
US 5624679	A 29-04-1997	US US AU WO US US US US US US US US US US AU AU CA CN EP JP NZ TW WO	5623064 A 5622834 A 5917896 A 9639122 A1 2002091101 A1 6063911 A 5846952 A 5686115 A 5858350 A 5635493 A 2001055807 A1 695850 B2 1296995 A 2177823 A1 1142833 A 0731812 A1 9506126 T 277662 A 458987 B 9515343 A1	22-04-1997 22-04-1997 24-12-1996 12-12-1996 11-07-2002 16-05-2000 08-12-1998 11-11-1997 12-01-1999 03-06-1997 27-12-2001 27-08-1998 19-06-1995 08-06-1995 12-02-1997 18-09-1996 17-06-1997 27-04-1998 11-10-2001 08-06-1995

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. * **Recherche internationale No**

PCT/FR 02/01121

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61L27/38 C12N5/00 C12N5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61L C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 00 56251 A (CHONDROS INC) 28 septembre 2000 (2000-09-28) cité dans la demande page 31 -page 37 ---	1-8
X	WO 99 47186 A (SUH JUN KYO ; FU FREDDIE H (US); MATTHEW HOWARD (US); UNIV PITTSBUR) 23 septembre 1999 (1999-09-23) cité dans la demande exemple 13 ---	1-8 -- / --

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *g* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 juillet 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/08/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D₁ de Internationale No
PCT/FR 02/01121

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE MEDLINE 'en ligne! octobre 1998 (1998-10) ZHANG W ET AL: "'Tissue engineering of hyaline cartilage!" Database accession no. NLM11825472 XP002207812 abrégé & ZHONGHUA WAI KE ZA ZHI 'CHINESE JOURNAL OF SURGERY!', vol. 36, no. 10, octobre 1998 (1998-10), pages 591-593, ISSN: 0529-5815</p> <p>---</p> <p>US 5 624 679 A (HELTON MIKE ET AL) 29 avril 1997 (1997-04-29) alinéas '5.6.1.5!, '17.1!</p> <p>---</p> <p>FRANCIS SUH J-K ET AL: "Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review" BIOMATERIALS, vol. 21, no. 24, 15 décembre 2000 (2000-12-15), pages 2589-2598, XP004217422 ISSN: 0142-9612</p> <p>-----</p>	1-8
A		3
A		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document Internationale No

PCT/FR 02/01121

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0056251	A 28-09-2000	US 6378527 B1 AU 3626700 A EP 1171057 A1 WO 0056251 A1 US 2001014475 A1 US 2001051834 A1	30-04-2002 09-10-2000 16-01-2002 28-09-2000 16-08-2001 13-12-2001
WO 9947186	A 23-09-1999	AU 3097999 A WO 9947186 A1	11-10-1999 23-09-1999
US 5624679	A 29-04-1997	US 5623064 A US 5622834 A AU 5917896 A WO 9639122 A1 US 2002091101 A1 US 6063911 A US 5846952 A US 5686115 A US 5858350 A US 5635493 A US 2001055807 A1 AU 695850 B2 AU 1296995 A CA 2177823 A1 CN 1142833 A EP 0731812 A1 JP 9506126 T NZ 277662 A TW 458987 B WO 9515343 A1	22-04-1997 22-04-1997 24-12-1996 12-12-1996 11-07-2002 16-05-2000 08-12-1998 11-11-1997 12-01-1999 03-06-1997 27-12-2001 27-08-1998 19-06-1995 08-06-1995 12-02-1997 18-09-1996 17-06-1997 27-04-1998 11-10-2001 08-06-1995